

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dengan sampel minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata Seed Oil*). Tahap penelitian ini diantaranya yaitu skrining fitokimia, formulasi nanoemulsi minyak biji labu kuning, uji karakteristik fisik nanoemulsi minyak biji labu kuning, formulasi nanoemulgel minyak biji labu kuning, uji karakteristik fisik nanoemulgel minyak biji labu kuning, *cycling test* dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

B. Lokasi Penelitian

1. Penyiapan sampel minyak biji labu kuning dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
2. Formulasi dan uji karakteristik fisik nanoemulsi minyak biji labu kuning dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Formulasi, uji karakteristik fisik dan *cycling test* nanoemulgel minyak biji labu kuning dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

4. Uji antioksidan sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning metode DPPH dilakukan di Laboratorium Instrumen Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan sampel yaitu minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata Seed Oil*) yang diperoleh dari PT. Tamba Sanjiwani yang diformulasikan menjadi nanoemulsi sebagai bahan pembuatan nanoemulgel minyak biji labu kuning.

D. Definisi Operasional

1. Minyak biji labu kuning diperoleh dari PT. Tamba Sanjiwani.
2. Nanoemulsi minyak biji labu kuning merupakan minyak biji labu kuning yang diformulasikan dalam bentuk nanoemulsi dengan metode emulsifikasi sebagai bahan untuk memformulasikan nanoemulgel.
3. Karakteristik fisik nanoemulsi minyak biji labu kuning meliputi uji pH dan uji ukuran partikel.
4. Nanoemulgel minyak biji labu kuning merupakan nanoemulsi minyak biji labu kuning yang diformulasikan dalam bentuk nanoemulgel dengan konsentrasi pada formula 1 sebanyak 3% dan formula 2 sebanyak 6%.
5. Karakteristik fisik nanoemulgel minyak biji labu kuning meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, sineresis, sentrifugasi.

6. *Cycling test* adalah penentuan stabilitas fisik dari nanoemulgel minyak biji labu kuning yang diuji pada suhu 4°C dan 40°C selama 6 siklus.
7. Aktivitas antioksidan nanoemulgel gel minyak biji labu kuning ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀ dari hasil dianalisis menggunakan metode DPPH.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi nanoemulsi minyak biji labu kuning formula 1 sebanyak 3% dan pada formulasi 2 sebanyak 6%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah karakteristik fisik, stabilitas fisik dan aktivitas antioksidan nanoemulgel minyak biji labu kuning yang diukur dengan metode DPPH yang ditunjukkan dengan nilai IC₅₀.

3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu waktu, kelembaban, kecepatan pengadukan, suhu.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi (Iwaki), neraca analitik (OHAUS), gelas ukur (Iwaki), mortir (RAS), stamper (RAS), spatula, pipet ukur (Iwaki) dan filler (D&N), cawan porselin (RAS), *ultraturax* (IKA T25), Sentrifugasi (Gemmy 12hole), pH meter (OHAUS), *object glass*

(One Lab), *stopwatch* (Merk), Particle Size Analyzer (Malvern), viscometer brookfield (DV2T), climatic chamber (Mettler), jangka sorong, objek gelas, labu ukur (Iwaki), mikropipet (Mettler Toledo), kulkas (Polytron), kuvet (Quartz Cuvetts), spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu 1900).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, minyak biji labu kuning (PT. Saraswati Indo Gonetech), HCl pekat (p.a, Merck), magnesium (p.a, Merck), tween 80 (Farmasetis MKR), span 80 (Farmasetis MKR), PEG 400 (Farmasetis MKR), karbopol (Farmasetis MKR), TEA (Farmasetis MKR), propilenglikol (Farmasetis MKR), metil paraben (Farmasetis MKR), aquadest (Farmasetis MKR), DPPH (Sigma aldrich), Vitamin C (Farmasetis MKR), etanol p.a (p.a, Merck).

G. Prosedur Kerja

1. Skrining Fitokimia Flavonoid

Minyak biji labu kuning sebanyak 0,5 mL dimasukkan dalam tabung reaksi. Magnesium 2 mg ditambahkan dalam tabung reaksi dan diteteskan HCl pekat sebanyak 10-15 tetes hingga terjadi perubahan warna dari kuning kehijauan menjadi merah-orange jika positif mengandung senyawa flavonoid (Mailuhu *et al.*, 2017).

2. Formulasi Nanoemulsi

Konsentrasi minyak biji labu kuning yang digunakan untuk membuat sediaan nanoemulsi ini mengacu pada penelitian (Purwandari *et al.*, 2021) serta konsentrasi bahan lain sebagai surfaktan dan kosurfaktan mengacu pada

penelitian (Hidayah *et al.*, 2022; Annaura *et al.*, 2022). Formula nanoemulsi minyak biji labu kuning dapat dilihat pada Tabel 3. 1.

Tabel 3. 1. Formula Nanoemulsi MBLK

Bahan	Formula % (b/b)	Fungsi
Minyak biji labu kuning	4	Bahan aktif
Tween 80	4,5	Surfaktan
Span	1	Surfaktan
PEG 400	2	Kosurfaktan
Aquadest ad	100	Pelarut

Pembuatan nanoemulsi dimulai dengan menimbang minyak biji labu kuning sebanyak 4 gram, tween 80 sebanyak 4,5 gram, span 80 sebanyak 1 gram dan PEG 400 sebanyak 2 gram. Minyak biji labu kuning, tween 80, span 80 dan PEG 400 dimasukkan dalam beaker glass dan dihomogenkan dengan alat *ultraturax* selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Aquadest ditambahkan sedikit demi sedikit sampai volume mencapai 100 mL. Campuran bahan selanjutnya diaduk dan diperkecil ukuran partikel dengan alat *ultraturax* selama 60 menit dengan kecepatan 8000 rpm (Purwandari *et al.*, 2021).

3. Karakteristik Fisik Nanoemulsi Minyak Biji Labu Kuning

a. Uji pH

Sediaan nanoemulsi minyak biji labu kuning ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 mL dan diukur dengan menggunakan pH meter (Ginting *et al.*, 2022).

b. Uji Ukuran Partikel

Pengujian ukuran partikel nanoemulgel minyak biji labu kuning dengan memasukan sediaan kedalam kuvet sampai tanda batas dan

dimasukkan ke dalam sampel holder, alat akan mengukur sampel selama ± 15 menit. Setelah 15 menit, alat akan menunjukkan ukuran partikel dan kurva (Andini *et al.*, 2023).

4. Formulasi Nanoemulgel Minyak Biji Labu Kuning

Formula dan variasi jumlah nanoemulsi minyak biji labu kuning yang digunakan untuk membuat formula nanoemulgel mengacu pada penelitian (Ariyanti *et al.*, 2023; Dasawanti *et al.*, 2022; Setiawati *et al.*, 2021). Formula nanoemulgel minyak biji labu kuning dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 3. 2.

Tabel 3. 2. Formula Nanoemulgel MBLK

Bahan	Formula % (b/b)		Fungsi
	F1	F2	
Nanoemulsi MBLK	3	6	Zat aktif
Karbopol	1	1	Gelling agent
TEA	0,2	0,2	alkalizing agent
Metil paraben	0,2	0,2	Pengawet
Propilen glikol	5	5	Humektan
Aquadest ad	100	100	Pelarut

Pembuatan basis gel dimulai dengan mengembangkan karbopol sebanyak 1 gram selama 1 jam hingga mengembang sempurna. TEA ditambahkan sebanyak 0,2 gram dan propilen glikol sebanyak 5 gram dan diaduk hingga terbentuk massa gel. Metil paraben sebanyak 0,2 gram dilarutkan dengan 20 bagian air mendidih (titik didih 100°C). Nanoemulsi minyak biji labu kuning dan basis gel dimasukkan dalam mortir kemudian digerus dan dihomogenkan dengan alat *ultraturax* dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit.

5. Uji Karakteristik Fisik

a. Uji Organoleptis

Sediaan diamati secara visual yang meliputi bentuk, bau dan warna sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning (Andini *et al.*, 2023).

b. Uji Homogenitas

Masing-masing nanoemulgel minyak biji labu kuning ditimbang sebanyak 500 mg dan diratakan pada objek glass. Sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning menunjukkan homogen jika tidak terlihat adanya butiran kasar (Putriani *et al.*, 2022).

c. Uji pH

Masing-masing formula sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan diukur menggunakan pH meter (Andini *et al.*, 2023).

d. Uji Viskositas

Pengujian viskositas nanoemulgel minyak biji labu kuning menggunakan viskometer *Brookfield DV2T* dengan ukuran spindle no. 64. Sediaan nanoemulgel dalam beaker glass 100 ml dimasukkan dalam spindle dan diatur pada kecepatan 50 rpm selama 1 menit. Hasil viskositas sediaan muncul pada monitor viscometer (Andini *et al.*, 2023).

e. Uji Daya Sebar

Sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning sebanyak 500 mg diletakkan di tengah 2 objek glass selama 1 menit (diukur diameternya),

dilanjutkan dengan beban 50 gram sampai dengan 250 gram hingga tidak mengalami pelebaran/penyebaran (Andini *et al.*, 2023).

f. Uji Daya Lekat

Masing-masing formula sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning sebanyak 0,1 gram diletakkan ditengah 2 *objek glass*. Diberi beban 1 kg selama 15 menit. Tuas ditarik, dan dihitung waktu yang dibutuhkan untuk 2 *objek glass* terpisah (Suwarni *et al.*, 2022).

g. Uji sentrifugasi

Masing-masing formula dimasukkan dalam tabung sentrifugasi 10 ml. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit (Pambudi *et al.*, 2023).

h. Uji sineresis

Masing-masing formula nanoemulgel MBLK sebanyak 1 gram disimpan pada suhu ± 10 °C dan diamati pada waktu 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Masing-masing nanoemulgel ditempatkan pada cawan selama penyimpanan. Hasil penyimpanan ditimbang dan dihitung nilai sineresinya menggunakan rumus sineresi (Praptiwi *et al.*, 2014).

$$\text{Rumus Sineresis} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

6. Uji Stabilitas Metode *Cycling test*

Sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning disimpan pada suhu ± 4 ° C selama 24 jam, lalu ditempatkan pada suhu ± 40 ° C selama 24 jam. Percobaan ini diulangi sebanyak 6 siklus dan hasil percobaan diuji organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat dan daya sebar (Hawilla *et al.*, 2023).

7. Uji Antioksidan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

DPPH sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a 10 ml (1000 ppm). Kemudian larutan DPPH 1000 ppm diencerkan menjadi 20 ppm dengan memipet 2 ml dan dilarutkan dengan etanol p.a 100 ml (Togelang *et al.*, 2022).

b. Penentuan Panjang Gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 20 ppm dibaca absorbansi pada panjang gelombang 400-600 nm (Togelang *et al.*, 2022).

c. Pengukuran *Operating Time*

Larutan DPPH 20 ppm diukur *operating time* pada panjang gelombang maksimum selama 30 menit (Togelang *et al.*, 2022)(Togelang *et al.*, 2022).

d. Pengukuran Absorbansi Larutan Blanko

Larutan blanko dibuat dengan perbandingan 4:1 dimana 4 mL untuk etanol dan 1 mL untuk DPPH. Lalu diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Baku Pembanding Vitamin C

Pembuatan larutan Vitamin C sebagai pembanding dibuat dalam konsentrasi 100 ppm dengan melarutkan 10 mg vitamin C dalam 100 ml etanol p.a. diencerkan dalam seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 ppm. Masing-masing dibuat dengan perbandingan 4:1 dimana 4 mL untuk seri

konsentrasi vitamin C dan 1 mL untuk DPPH. Lalu diukur pada panjang gelombang maks yang diperoleh (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

- f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel Minyak Biji Labu Kuning, nanoemulsi MBLK, nanoemulgel MBLK

Larutan stok sampel minyak biji labu kuning, nanoemulsi dan nanoemulgel MBLK dibuat pada konsentrasi 100 ppm dengan cara melarutkan 10 mg dalam 100 ml etanol p.a, kemudian diencerkan pada rentang konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Siapkan masing-masing dengan perbandingan 4: berbanding 1. Disini 4 ml untuk rangkaian konsentrasi sampel dan 1 ml untuk DPPH. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang maks yang diperoleh (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

H. Analisis Data

Analisis data dilakukan pada karakteristik fisik dan antioksidan pada sediaan nanoemulgel minyak biji labu kuning untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi nanoemulsi MBLK terhadap karakteristik fisik dan nilai IC_{50} . Karakteristik fisik yang dievaluasi meliputi pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, sineresis, sentrifugasi, organoleptis dan homogenitas. Data diolah dengan SPSS versi 26, dan dianalisis homogenitas menggunakan *Levene test*, dan untuk normalitas data menggunakan *Shapiro wilk*. Selanjutnya jika data yang diperoleh normal dan homogen maka dilanjutkan uji parametrik (ANOVA) dan uji non parametrik (*Kruskal Walls*) untuk data yang tidak normal.